

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-501698

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)2月23日

(51) Int. Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 P 21/08		9161-4B	
C 0 7 K 7/06		8318-4H	
14/705		8318-4H	
C 1 2 N 15/09			
		9050-4B	C 1 2 N 15/00 A
	審査請求	未請求	予備審査請求 有 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平5-510218
(86) (22) 出願日	平成4年(1992)11月25日
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)5月30日
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 2 / 1 0 1 4 0
(87) 国際公開番号	W O 9 3 / 1 1 1 6 2
(87) 国際公開日	平成5年(1993)6月10日
(31) 優先権主張番号	8 0 1, 7 9 8
(32) 優先日	1991年11月29日
(33) 優先権主張国	米国 (U S)

(71) 出願人	プロテイン デザイン ラブス, インコーポレイティド アメリカ合衆国, カリフォルニア 94043, マウンテン ビュー, ガルシア アベニュー 2375
(72) 発明者	ツォー, ジェイ, ユン アメリカ合衆国, カリフォルニア 94025, メンロパーク, #16, オーク グローブ アベニュー 445
(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二価特異性ヘテロ二量体

## (57) 【要約】

ロイシンジッパーにより形成される二価特異性抗体の製造及び利用方法を提供する。ヘテロ二量体を優先的に形成せしめることのできるロイシンジッパーはそれぞれ別々の結合特異性を含んで成るエピトープ結合性成分に連結されている。二価特異性抗体はロイシンジッパーの対合的会合により形成され、2つの異なるエピトープ結合性成分を連結せしめるヘテロ二量体を形成する。ヘテロ二量体は、二価特異性抗体を形成する2つのロイシンジッパー領域の相互作用により起こる。かかる二価特異性抗体はジスルフィド結合の如きの分子間化学結合によって更に安定となりうる。モノマーサブユニット間のかかる分子間結合の形成の後、ロイシンジッパーは除去又は残してよい。これらの方法により生成される二価特異性抗体は実質的に純粋であり、そして高収率で大量スケールで生産されうる。他方、二価特異性ヘテロ二量体はエピトープ結合性成分ではない巨大分子物質にエピトープ結合性成分を連結することにより形成されうる。

## 請求の範囲

1. 二価特異性抗体であって：  
第一エビトープ結合性成分に連結した第一ロイシンジッパーを含んで成る第一タンパク質；及び  
第二エビトープ結合性成分に連結した第二ロイシンジッパーを含んで成る第二タンパク質；を含んで成り、ここで前記第二ロイシンジッパーが前記第一ロイシンジッパーに対する対合的親和性を有している、二価特異性抗体。
2. 一方のロイシンジッパーが Posロイシンジッパーである、請求項1に記載の二価特異性抗体。
3. 一方のロイシンジッパーが Junロイシンジッパーである、請求項1に記載の二価特異性抗体。
4. 二価特異性抗体であって：  
第一エビトープ結合性成分に連結した Posロイシンジッパーを含んで成る第一タンパク質；及び  
第二エビトープ結合性成分に連結した Junロイシンジッパーを含んで成る第二タンパク質；  
を含んで成る二価特異性抗体。
5. 前記の第一及び第二ロイシンジッパーが共に構造式（ロイシン-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>）であり、ここで各X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>及びX<sub>7</sub>は常用の20のアミノ酸より成る群から選ばれ、そしてnが少なくとも3の整数である、請求項1に記載の二価特異性抗体。
6. 前記第一ロイシンジッパーが図1(b)に示すアミノ酸配列を有し、そして前記第二ロイシンジッパーが図1(a)に示すアミノ酸配列を有す、請求項1に記載の二価特異性抗体。

共に構造式（ロイシン-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>）に相当するアミノ酸配列を含んで成り、ここで各X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>及びX<sub>7</sub>は常用の20のアミノ酸より成る群から選ばれ、そしてhは少なくとも3の整数である、請求項11に記載の方法。

15. 前記の第一タンパク質と第二タンパク質との前記の接触をインビトロで行う、請求項11に記載の方法。

16. 前記の第一タンパク質と第二タンパク質との前記の接触をこの第二タンパク質を発現する単一の細胞の中でインヒボで行う、請求項11に記載の方法。

17. 二価特異性抗体を製造するための方法であって：

第一エビトープに結合可能な第一エビトープ結合性成分に連結した第一ロイシンジッパーを含んで成る第一タンパク質を作り；

第二エビトープに結合可能な第二エビトープ結合性成分に連結した第二ロイシンジッパーを含んで成る第二タンパク質を作り（ここで前記第二ロイシンジッパーは前記第一ロイシンジッパーに対する対合的親和性を有する）；

前記第一タンパク質を前記第二タンパク質と接触させてヘテロ二量体を形成せしめ；

この第一エビトープ結合性成分と第二エビトープ結合性成分との間で直接結合を形成せしめ（ここでこの直接結合が形成された後、ロイシンジッパー配列はエビトープ結合性成分から分離でき、且つ前記直接結合は保持される）；

前記第一ロイシンジッパーと前記第一エビトープ結合性成分との間の結合を切断し；次いで

前記第二ロイシンジッパーと前記第二エビトープ結合性成分との間の結合を切断して、第二エビトープ結合性成分に連結した第一エビトープ結合性成分のヘテロ二量体を含んで成る二価特異性抗体を

7. 前記第一エビトープ結合性成分がヒトIL-2レセプタータンパク質に、約10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>以上の親和力で結合する、請求項1に記載の二価特異性抗体。

8. 前記第一エビトープ結合性成分がヒトCD3タンパク質に、約10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>以上の親和力で結合する、請求項1に記載の二価特異性抗体。

9. 前記第一エビトープ結合性成分が Fab' である、請求項1に記載の二価特異性抗体。

10. 前記エビトープ結合性成分の少なくとも一方がヒト化イムノグロブリンである、請求項1に記載の二価特異性抗体。

11. 二価特異性抗体の製造方法であって：

第一エビトープに結合可能な第一エビトープ結合性成分に連結した第一ロイシンジッパーを含んで成る第一タンパク質を作り；

第二エビトープに結合可能な第二エビトープ結合性成分に連結した第二ロイシンジッパーを含んで成る第二タンパク質を作り（ここで前記第二ロイシンジッパーは前記第一ロイシンジッパーに対する対合的親和性を有する）；そして

前記第一タンパク質を前記第二タンパク質と、P(ab'-ジッパー)-ヘテロ二量体の形成が可能な条件において接触させて前記二価特異性抗体を形成せしめること；  
を含んで成る方法。

12. 一方のロイシンジッパーが Pos又は Junロイシンジッパーである、請求項11に記載の方法。

13. 一方のロイシンジッパーが Posロイシンジッパーであり、そして他方のロイシンジッパーが Junロイシンジッパーである、請求項11に記載の方法。

14. 前記第一ロイシンジッパー及び前記第二ロイシンジッパーが

形成せしめること；

を含んで成る方法。

18. エビトープ結合性成分の少なくとも一方が Fab' である、請求項17に記載の方法。

19. 前記第一エビトープ結合性成分と前記第二エビトープ結合性成分との間の前記の結合がジスルフィド結合である、請求項17に記載の方法。

20. 結合した第一及び第二エビトープ結合性成分を前記の切断した第一及び第二ロイシンジッパーから単離する段階を更に含んで成る、請求項17に記載の方法。

21. エビトープ結合性成分からのロイシンジッパーの切断を、ヒドロキシルアミンにより切断できうるアスパラギン-グリシンペプチド結合を含んで成る連結において行う、請求項17に記載の方法。

22. エビトープ結合性成分及びロイシンジッパーを含んで成るポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチドを含んで成る組成物。

23. 前記ロイシンジッパーが Jun 又は Posロイシンジッパーである、請求項22に記載の組成物。

24. ロイシンジッパー、並びに V<sub>H</sub>C<sub>H1</sub>及び抗体重鎖のヒンジドメインを含んで成るエビトープ結合性成分をエンコードするポリヌクレオチド。

25. 前記のエンコードされるエビトープ結合性成分が Fab' である、請求項23に記載のポリヌクレオチド。

## 二価特異性ヘテロ二量体

## 発明の技術分野

本発明は二価特異性抗体、他のエпитープ結合性成分と特異的なヘテロ二量体を形成することのできるエпитープ結合性成分、かかる二価特異性抗体及びエпитープ結合性成分を作るための方法、かかる二価特異性抗体及びエпитープ結合性成分を利用する方法、並びにかかると二価特異性抗体及びエпитープ結合性成分を含む薬理組成物に関する。

## 発明の背景

二価特異性抗体は二重エпитープ結合特異性を有する抗体であり、第一の特異性は第一エпитープに結合する能力であり、そして第二の特異性は第二エпитープに結合する能力である。

かかる二価特異性抗体は、ある意味において、免疫療法にとって潜在的に価値のある分子である。例えば、二価特異性抗体は標的細胞に細胞傷害性エフェクター細胞を架橋せしめることができ (Segal と Solder, (1989) *Chem. Immunol.* 47: 179)、標的細胞を殺傷をもたらす。

莫大な数の二価特異性抗体がインビトロで有効性を示している (Gilliland ら, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7719; Lanzavecchia と Scheidegger (1987) *Eur. J. Immunol.* 17: 105; Stears と Bavan (1986) *Immunol. Today* 7: 241; Berg ら (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4732)、治療剤として臨床試験されているものはあまりない。治療剤として二価特異性抗体の開発

の遅さの一つの理由は、十分な純度及び量においてそれらを製造するうえでの困難性にある。

二価特異性抗体は化学架橋により、ハイブリド-ハイブリドマにより (Hilal et al. (1984) *Immunol. Today* 5: 299) もしくはトランスフェクтомより、又は二種の Fab' のヒンジでのジスルフィド交換により製造されてきた。その第一の方法は不均質、且つ一定でない生成物をもたらしてしまう。第二の方法は数多くのハイブリド-抗体副産物に原因して二価特異性抗体の多大なる精製を必要とし、その副産物の存在は細胞の集積活性を妨害しうる。ジスルフィド交換法は本質的に P(ab')<sub>2</sub> にのみ適用され、従って酵素消化による切断に対するモノクローナル抗体の感受性によって制約される (Parham (1983) *J. Immunol.* 131: 2895)。更に、Fab' は互いに対して強い親和力を有するため、Fab' 間ジスルフィド結合の形成のために非常に高いタンパク質濃度を必要とする。このジスルフィド交換法は、Fab' の一方を他方の Fab' で酸化する前に改変せしめる Eileen 試薬の利用により、ホモ二量体の発生率を引き下げることで改善されている (Brennan ら, (1985) *Science* 229: 81)。しかしながら、この改善によってさえも、ヘテロ二量体の P(ab')<sub>2</sub> は 50% 以上の収率で生成されることはめったにない (Gianni ら, (1987) *J. Immunol.* 139: 2367)。

従って、効率的に二価特異性抗体及びその他の類似化合物を高純度で生産するための改良方法が明らかに要望されている。

## 発明の概要

本発明は二価特異性抗体の生産のための新規の方法であって：

- 1) 例えば遺伝子発現によって P(ab')<sub>2</sub>、及び／又はその他のエピトープ結合性成分を直接生成すること、並びに 2) 二価特異性抗体の

効率的な生産を確実なものとするためにヘテロ二量体形成用配列を利用すること、を含む。利用するその配列は転写因子 Fos 及び Jun のロイシンジッパー (Landshulz ら (1988) *Science* 240: 1759、及び参考のため、Maniatis と Abel (1989) *Nature* 341: 24 を参照のこと；共に引用することで本明細書に組入れる) 領域に由来する。ロイシンジッパーは約 20-40 残基の長さの特定のアミノ酸配列であり、ロイシンが一般に 7 個の残基毎に見い出せる。かかるジッパー配列は両親縁性  $\alpha$ -ヘリックスを形成しており、ここでロイシン残基は二量体の形成のために疎水側に並んでいる。Fos 及び Jun タンパク質のロイシンジッパーに相当するペプチドはヘテロ二量体を優先的に形成する (O' Shea ら, (1989) *Science* 245: 646)。

本発明においては、二種のジッパー配列を、二種の Fab' に融合したときに二価特異性 P(ab')<sub>2</sub> 形成を助長せしめるように採用している。二価特異性抗体は、二種類のジッパー配列の対合的会合が、一方のジッパーを含む第一 Fab' 又はその他のエピトープ結合性成分を、他方のジッパーを含む第二 Fab' 又はその他のエピトープ結合性成分に連結せしめる本発明の方法により作られる。これらの態様において、ヘテロ二量体分子は両方のエピトープ結合性成分の結合特性を含んで成るであろう。

本発明は、エピトープ結合性成分に連結されているロイシンジッパーを含む第一タンパク質と、エピトープ結合性成分に連結されているロイシンジッパーを含む第二タンパク質とより形成された二価特異性抗体を提供し、ここでこの第一及び第二タンパク質のロイシンジッパーは、この第一及び第二タンパク質を含んで成るヘテロ二量体が形成するほどの対合的親和力を有する。本発明のある態様において、ロイシンジッパーの一方は Fos ロイシンジッパー又は Jun ロイシンジッパーである。本発明の一種態様において、一方のロイ

シンジッパーは Fos ロイシンジッパーであり、そして他方は Jun ロイシンジッパーである。本発明はまた、構造配列 (ロイシン-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>) の第一及び第二ロイシンジッパーを有する二価特異性抗体を提供し、ここで X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> 及び X<sub>6</sub> のそれぞれは常用の 20 アミノ酸のうちのいずれかであり、そして n は少なくとも 3 の整数である。

本発明はヒト IL-2 レセプターに結合する二価特異性抗体及びヒト CD3 タンパク質に結合する二価特異性抗体を提供する。本発明はまた、Fab' である少なくとも一のエピトープ結合性成分を有する二価特異性抗体を提供する。本発明の一定の態様は、ヒト化イムノグロブリンである少なくとも一のエピトープ結合性成分を有する。

本発明はまた、二価特異性抗体を製造するための方法を提供し、ここで第一及び第二タンパク質を作り (それぞれエピトープ結合性成分とロイシンジッパーとを含む)、次いでその第一と第二タンパク質を、二価特異性抗体が形成されるようヘテロ二量体の形成を可能にする条件のもとで接触させる。第一及び第二タンパク質の接触はインビトロで、又は両方のタンパク質を発現する単一の細胞の中でインビボで行ってよい。ある態様において、本方法は式 (ロイシン-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>)。 (ここで、X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> 及び X<sub>6</sub> のそれぞれは常用の 20 アミノ酸のうちのいずれかであり、そして n は少なくとも 3 の整数である) に相当する Fos もしくは Jun ロイシンジッパー、又はその他の類似のロイシンジッパーを有するタンパク質を利用する。本発明のある方法において、P(ab'-ジッパー)<sub>2</sub> ヘテロ二量体二価特異性抗体は最終生成物として生産されるか、又はそれはロイシンジッパーを除去するために切断 (例えばヒドロキシルアミンによるアスパラギン-グリシンペプチド結合の切断) して二つの Fab' が化学結合 (例えばジス

ルフィド結合により)しているP(ab')<sub>2</sub>二価特異性抗体をもたらし  
てよい。Fab' 以外のエпитーブ結合性成分が、ロイシンジッパー  
は除去されているが化学結合によって連結している二価特異性抗体  
を形成するために本発明の方法において用いることができる。

本発明はまた、エピトープ結合性成分及びロイシンジッパーを含  
む、特にV、CH、及び抗体の重鎖のヒンジドメインを有するエピ  
トープ結合性成分、そしてより詳しくは Fab' を含むタンパク質をコ  
ードするポリヌクレオチドを提供する。

Fab' 以外のエピトープ結合性成分を用いている、及び/又は二  
価特異性抗体の一方の成分がエピトープ結合性成分ではない巨大分  
子物質であるその他の二価特異性抗体もこれらの方法により作ること  
ができる。

本発明はまた、二価特異性抗体の薬理組成物、かかる二価特異性  
抗体の治療的利用、診断及び研究用途における二価特異性抗体を利用  
する方法及び組成物を包括する。

#### 図面の簡単な説明

図1。Jun(A)及びFos(B)ロイシンジッパーの配列。矢印はイ  
ントロンH: C<sub>α</sub>2 及びエクソンC<sub>α</sub>2 間のスプライシング部位を示す。

図2。抗-Tac-Jun(A)及び抗-CD3-Fosの発現のためのプ  
ラスミドの構築の図式。コード配列を枠として示す。制限部位につ  
いての記号は: B, BamHI; P, PstI; H, HindIII; S, SalI;  
X, XbaI; そしてXb, XhoI。

図3。ラット抗-マウスカッパーセファロースにより精製した抗  
-Tac-Jun及び抗-CD3-FosのSDS PAGE分析。タンパク質を  
12.5%のポリアクリルアミドゲルで分析し、そしてクマジーブルー  
で染めた。レーン1, 2, 3は精製抗CD3-Fos、そしてレーン4、

5, 6は非還元条件のもとで泳動させた抗-Tac-Junである。レ  
ーン7, 8, 9は抗-CD3-Fos、そしてレーン10, 11, 12は非還  
元条件下で泳動させた抗-Tac-Jun。M.W.マーカーは: ホスホリ  
ラーゼb, 94kd; ウシ血清アルブミン, 67kd; オвалブミン, 43kd;  
カルボニックアンヒドラーゼ, 30kd; ダイズトリブシンインヒビタ  
ー, 20kd; そしてリゾチーム, 14kdである。略語は: P(ab')<sub>2</sub>,  
P(ab'-ジッパー)<sub>2</sub>; LC, 軽鎖; そしてFd, Fd-ジッパー。

図4。PPLCによるBAKERBOND ABx カラムでの抗-Tac-Jun及び  
抗-CD3-Fos 免疫性超トランスフェクト体の使用済培養地の分離。

(A)(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の勾配により分離させた際の280nmでのタンパク質  
の吸収プロフィール。早めに溶解したタンパク質(画分T)はトラ  
ンスフェリン及びインスリンの如きの主たる培地補助物である。

(B) ELISAにより決定したマウスIgG 陽性画分。414nmでの吸収  
は、ペルオキシダーゼ-コンジュゲート化ヤギ抗-マウスIgG であ  
る二次抗体により発色した色を示す。(C) フローサイトメトリー  
によりアッセイした種々の画分についての抗CD3 (○)及び抗-  
Tac(■) 活性。

図5。画分II由来の二価特異性抗体により仲介された標的化細胞  
障害性。100:1 (○)、25:1 (○)及び10:1 (■)の比でのエ  
フェクター及び<sup>51</sup>Cr-ラベル化標的細胞を、特異的な溶解のために  
画分IIの様々な希釈物とインキュベートした(図4A)。点は三重  
測定の前平均値を示す。タンパク質濃度はフローサイトメトリーに  
より評価した。

図6。非還元条件下でのSDS PAGEにより分析した、インビトロで  
の二価特異性P(ab'-ジッパー)<sub>2</sub>の形成。レーン1、還元前の抗-  
Tac-Jun; レーン3: 4 mMの2-メルカプエチルアミンにより還  
元した後の抗-Tac-Jun; レーン4、2 mMの2-メルカプエチ

ルアミンで還元した後の抗CD3-Fos、そしてレーン5、レドック  
ス緩衝液に対して透析した後の抗-Tac-Jun × 抗-CD3-Fos。  
全てのタンパク質サンプルを、サンプルSDS バッファー中で煮沸す  
る前に、遊離スルフィドをブロックするために20mMのヨードア  
セトアミドで処理した。M.W.マーカーは図3の中で用いているもの  
と同じである。それらは使用前に還元用サンプルSDS バッファーの  
中で煮沸した。略語は: P(ab')<sub>2</sub>, P(ab'-ジッパー)<sub>2</sub>; Fab',  
Fab'-ジッパー; そしてLC, 軽鎖。

図7。インビトロで形成した二価特異性P(ab'-ジッパー)<sub>2</sub>の画分。  
インビトロで形成せしめた抗-Tac-Jun × 抗-CD3-Fos を、  
BAKERBOND ABx カラムに載せる前に10mMのMES バッファーpH5.2に  
対して透析した。カラムに結合したタンパク質を(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の勾配に  
より溶出させた。(A) 280nmでの吸収プロフィール。(B) フロ  
ーサイトメトリーによりアッセイした種々の画分についての抗-  
CD3 (○)及び抗-Tac (■) 活性。

図8。(A) 非還元又は(B) 還元条件下で泳動させた図7にお  
けるピーク画分のSDS PAGE分析。レーン1、ABx カラム素通り画分;  
レーン2、画分I; レーン3、画分II; レーン4、画分III; そして  
レーン5、画分IV。サンプリングのために画分II及び画分IVからよ  
り多くの容量(5倍)を取った。M.W.マーカーは図3に用いたもの  
と同じである。略語は: P(ab')<sub>2</sub>, P(ab'-ジッパー)<sub>2</sub>; LC, 軽鎖;  
そしてFd, Fd-ジッパー。

図9。インビトロで形成した二価特異性抗-Tac-Jun × 抗-  
CD3-Fosにより仲介された標的化細胞障害性。25:1 (○)及び  
10:1 (○)の比でエフェクター及び<sup>51</sup>Cr-ラベル標的細胞を、特  
異的な溶解のために種々の濃度の画分III(図7A)とインキュベ  
ートした。

#### 発明の詳細な説明

本発明に従い、二価特異性抗体、かかる二価特異性抗体の製造方  
法、二価特異性抗体の薬理組成物、かかる二価特異性抗体の治療的  
利用、並びに診断及び研究用途において二価特異性抗体を利用す  
るための方法及び組成物を提供する。

#### 定義

「P(ab')<sub>2</sub>」ヘテロ二量体は本明細書では、第一エピトープに対  
する結合特異性を有する第一 Fab' 及び第二エピトープに対する結  
合特異性を有する第二 Fab' を含んで成る二量体と定義し、ここで  
この第一と第二エピトープは同一ではない。

「Fab'-ジッパー」は、ロイシンジッパーに連結している Fab'  
と定義する。

「P(ab'-ジッパー)<sub>2</sub>」は本明細書では、第一エピトープに対す  
る結合特異性を有し、且つロイシンジッパーに連結している第一  
Fab'、及び第二エピトープに対する結合特異性を有し、且つロイ  
シンジッパーに連結している第二 Fab' を含んで成る二量体と定義  
し、ここで前記第一及び第二エピトープは同一でない。

本発明の「エピトープ結合性成分」は、イムノグロブリン超科の  
遺伝子により実質的にエンコードされる1又は数種のポリペプチド  
より成るタンパク質を意味する(例えば、The Immunoglobulin Gene  
Superfamily, A.F. WilliamsとA.N. Barclay, Immunoglobulin  
Genes, T. Honjo, F.W. Alt とT.H. Rabbitts 編(1988) Academic  
Press: San Diego, CA, 頁361-387を参照のこと; 引用すること  
で本明細書に組入れる)。例えば、限定するわけではないが、エ  
ピトープ結合性成分は重鎖の一部もしくは全体と、軽鎖の一部もしくは  
全体とを含んで成るか、又は重鎖の一部もしくは全体を含んで成  
りうる。しかしながら、エピトープ結合性成分は、特異的な標的又

はエプトープに対する結合特性を維持するよう、イムノグロブリン超科遺伝子生成物の十分なる領域を含むべきである。

#### ロイシンジッパー

近年、「ロイシンジッパー」としてデザインされているタンパク質構造のモチーフが同定されている (Landshulzら(1988) *Science* 240: 1759)。ロイシンジッパーは当業界で、互いに6個のアミノ酸により離されている4〜5個のロイシン残基を含む約35個のアミノ酸の鎖として定義されている (Maniatis と Abel(1989) *Nature* 341: 24)。ロイシンジッパーは様々な真核系DNA-結合性タンパク質、例えばGCN4、C/EBP、C-fos 遺伝子生成物 (Fos)、C-jun 遺伝子生成物及びC-myc 遺伝子生成物の中で見い出されている。これらのタンパク質において、ロイシンジッパーは二量体の界面を供し、ここでロイシンジッパーを含むタンパク質は安定なホモ二量体及び/又はヘテロ二量体を形成しうる。

2種のプロト-オンコジーン、C-fos 及びC-jun によりエンコードされるタンパク質生成物の分子分析は、優先的なヘテロ二量体の形成の如きの現象を示した。これら両者のDNA-結合性タンパク質はロイシンジッパー領域を含むが、しかしながらJun はホモ二量体を形成することができ、そしてFos とJun と互いにヘテロ二量化することができ、Fos のホモ二量化の証拠はほとんど認められていない (Gentz ら、(1989) *Science* 243: 1695; Nakabeppu ら(1988) *Cell* 55: 907; Cohen ら(1989) *Genes Dev.* 3: 173)。従って、Fos ロイシンジッパーはJun と優先的に二量化でき、その理由はJun ロイシンジッパーとFos ロイシンジッパーとの間のヘリックス界面での特徴的な相互作用にある (O' Shea ら、前掲; Scheemann ら(1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 739)。

Fos 及びJun のロイシンジッパー領域を含んで成る合成ペプチド

最も好ましくは85%以上のヘテロ二量体である二量体集団をもたらす。「Fos ロイシンジッパー」は図1(b)に示す配列に実質的に類似するアミノ酸配列として定義する。「Jun ロイシンジッパー」は図1(b)に示す配列に実質的に類似するアミノ酸配列として定義する。当業者は、本発明のロイシンジッパーが、図1に示すものとは、例えば限定するわけではないが内部もしくは末端付加、欠失もしくは置換により、又は7残基反復の順序が入れ代わっていることにより同一でないアミノ酸配列を含んで成りうることを理解するであろう。例示のため、しかしながら限定するわけではなく、本発明はグリシン及び/又はシステインを含んで成る末端アミノ酸の付加又は置換を包括する。

Jun 及びFos タンパク質のロイシンジッパー領域は通常、タンパク質を互いに結合せしめて転写因子、AD-1を形成せしめるように働く。Jun 及びFos ジッパーは、それらが遺伝的に融合している他のタンパク質、例えば二価特異性抗体の2つのFab'とも二量化するであろう。2つのジッパーペプチドの対合的会合はホモ二量体よりもヘテロ二量体の形成の傾向により高いため、所望の生成物の形成は高まる。

#### 二価特異性抗体

二価特異性抗体の異なる結合特異性を有する二つのエプトープ結合性成分を連結することにより形成されうる。

本発明の「エプトープ結合性成分」とは、イムノグロブリン超科遺伝子により実質的にエンコードされ、且つ抗原のエプトープに対して特異的な結合親和性を有する一又は複数のポリペプチドにより成るタンパク質を意味する。認められているイムノグロブリン遺伝子超科はThe Immunoglobulin Gene Super family, A.P. Williams とA.M. Barclay、前掲に記載されている。イムノグロブリン遺伝子

は単独でヘテロ二量体形成に十分であり、そして合成ペプチドのアミノ末端それぞれが分子間ジスルフィド結合を可能とするようにシステイン残基を含むとき、ヘテロ二量体形成はホモ二量化の実質的な排除に対して起こる。

本発明のロイシンジッパーは7残基反復(ロイシン-X、-X、-X、-X、-X、-X、-X)として知られる一般構造式を有し、ここでXは任意の常用の20アミノ酸 (Proteins, Structures and Molecular Principles, (1984) Creighton(編)、W.H. Freeman and Company, New York; 引用することで本明細書に組入れる) であってよいが、最も好ましくは高い $\alpha$ -ヘリックス形成能力を有するアミノ酸、例えばアラニン、バリン、アスパラギン酸、グルタミン酸及びリジンであり、(Richardson と Richardson, (1988) *Science* 240: 1648)、そしてnは3以上であってよいが、しかしながら典型的には4又は5である。この20の常用のアミノ酸はグリシン、プロリン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、メチオニン、トリプトファン、フェニルアラニン、イソロイシン、ロイシン、バリン、アラニン、セリン、スレオニン、システイン、グルタミン、アスパラギン、チロシン、アスパラギン酸及びグルタミン酸である。

本発明のロイシンジッパーは対合的親和性を有する。ロイシンジッパーは両親水性アルファヘリックス、そしてより詳しくは巻型コイルを形成する。対合的親和性とは、ある種のロイシンジッパー、例えば限定するわけではないがFos ロイシンジッパーの、別の種のロイシンジッパー、例えば限定するわけではないがJun ロイシンジッパーとのヘテロ二量体を優先的に形成する能力と定義し、従って二種のロイシンジッパーが十分なる濃度で存在しているとき、ヘテロ二量体の形成がホモ二量体の形成に優先する。従って、ヘテロ二量体の形成は、典型的には50〜75%、優先的には75〜85%、そして

の特定の例にはカッパー、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、エプシロン及びミュー定常領域遺伝子、並びに莫大な数のイムノグロブリン可変領域遺伝子が含まれる。イムノグロブリンは抗体に加えて様々な形態において存在することができ、それには例えばFv、Fab 及びF(ab)'<sub>2</sub>、並びに一本鎖が含まれる (例えば、Euston ら、*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 5879-5883(1988) 及びBird ら、*Science*, 242: 423-426(1988)、これらは引用することで本明細書に組入れる)。(一般的には、Hood ら、「Immunology」Benjamin, N.Y. 第2版(1989) 及びHunkapiller と Hood, *Nature*, 323: 15-16(1986)を参照のこと; これらは引用することで本明細書に組入れる)。エプトープ結合性成分のその他の例にはT-細胞抗原レセプター及びCD4タンパク質が含まれ、これはHBC タンパク質上のエプトープに結合する。

「成熟」イムノグロブリンの天然の形態は、配列における1又は数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加により長さの点で若干変わりうるがよく知られている。従って、可変及び定常領域は共に実質的な天然改質に付されるが、しかしながら「実質的に同一」であり、且つその関連の活性を保持することが可能であり続けている。ヒト定常領域及び並び換え可変領域DNA配列は様々なヒト細胞、しかし好ましくは不死化B-細胞より、公知の手法に従って単離できる。類似の方法が非ヒト起源から非ヒトイムノグロブリン配列を単離するのに利用できる。発現及び分泌のためのDNA配列及び宿主細胞は数多くの起源、例えばアメリカン タイプ カルチャー コレクションより入手できる (Catalogue of Cell Lines and Hybridomas 第5版(1985)Rockville, Maryland, U.S.A.; これは引用することで本明細書に組入れる)。

イムノグロブリン鎖のこれらの天然形態に加えて、「実質的に同

一」である改質重鎖及び軽鎖が、当業者によく知られている様々な組換えDNA技術を利用することで簡単にデザイン及び製造できる。例えば、鎖は天然の配列より、数個のアミノ酸の置換、末端及び中間付加、及び欠失等によって一次構造レベルにおいて改変されうる。他方、一部の一次構造のみを含んで成るポリペプチドフラグメントを製造することができ、このフラグメントは1又は複数のイムノグロブリン活性（例えば結合活性）を保有しうる。特に、数多くの遺伝子と同様に、イムノグロブリン関連遺伝子は、それぞれが1又は複数の異なる生物活性を有している独立の機能性領域を含むことが知られる。一般に、所望のエピトープ結合性成分をエンコードする遺伝子の改質は様々な公知技術、例えば部位特異的突然変異誘発（Gillman と Smith, *Gene* 8: 81-97 (1979) 及び Roberts, S. ら *Nature* 328: 731-734 (1987) を参照のこと；共に引用することで本明細書に組入れる）によって容易に成し遂げることができる。本発明の好適な態様において、エピトープ結合性成分は「キメラ」又は「ヒト化」であるイムノグロブリン遺伝子によりエンコードされる（一般的には、Co と Queen (1991) *Nature*, 351: 501 を参照のこと；これは引用することで本明細書に組入れる）。

適当なエピトープ結合性成分は当業者により、当業界に公知のDNA配列又はモノクローナル抗体群から作ることができ、これはより詳しくは引用することで本明細書に組入れるWO 90/07861 及び米国出願07/310,252号に記載されている。

Fab' - Jun (Jun ロイシンジッパーを含む Fab') 及び Fab' - Pos (Pos ロイシンジッパーを含む Fab') タンパク質は、インビトロで、一細胞系における同時発現により、又は別々の細胞における発現液にインビトロで混合することにより、二価特異性抗体を作るのに利用できうる。このインビトロ混合手順は二価特異性抗体の大量

生産にとって好適である。Fab' に加えて、インビトロ混合により、その他のエピトープ結合成分をJun 又は Pos ロイシンジッパーに連結させ、そして組合せることができる。

インビトロ混合手順は、特定の Fab' - Pos 又は Fab' - Jun を一回のみ作り上げればよい利点を有しており、なぜならそれらは相補的ロイシンジッパーを含む様々なエピトープ結合性成分と組合せることができるからである。例えば、二価特異性抗体のT細胞結合性成分、即ち、Pos ロイシンジッパーと、T細胞抗原CD3に対する結合特異性部位を含んで成る Fab' は一回だけ作り上げればよく、なぜならこれらはJun ロイシンジッパーを含む様々なエピトープ結合性成分のいずれか、例えば所望の標的細胞に対する結合親和性を有する Fab' - Jun 分子と組合せることができるからである。更に、Fabフラグメントは大腸菌 (*Escherichia coli*) の中で高レベルで生産され、従って Fab' - ジッパー、二価特異性抗体は大量に経済的に生産される可能性もあり、臨床試験を可能にする。

エピトープ結合性成分に連結したロイシンジッパーは様々な方法で製造できうる。例えば、限定するわけではないが、ロイシンジッパーを含んで成る融合タンパク質をエンコードするポリヌクレオチド配列は細胞宿主により又はインビトロ翻訳系において発現されうる。他方、ロイシンジッパー及び/又はエピトープ結合性成分は化学ペプチド合成により、所望のポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチド配列の発現により、又はロイシンジッパー、抗体もしくは巨大分子物質を含むその他のタンパク質の切断及びその後の精製のいづれかにより、個別に製造できうる。かかる精製ポリペプチドは介在スパーサーアミノ酸配列を伴ってもしくは伴わないでペプチド結合により、又は介在スパーサー分子を伴ってもしくは伴わないで非ペプチド共有結合により連結することができ、ここで、この

後者のスパーサー分子はアミノ酸であるか、又はその他の非アミノ酸化学構造体のいずれかである。連結の方法又はタイプに関係なく、かかる連結は可逆性でありうる。例えば、限定するわけではなく、かかる可逆性連結は化学的に不安定な結合、ペプチジル又は他のものを含んで成ることができ、これは自発的に、又は熱、電磁線、プロテアーゼもしくは化学試薬による処理によって切断されうる。かかる可逆性連結の二つの例を例示のために挙げるが、それらに限定するわけではない。それらは：(1) ヒドロキシルアミンにより切断されうる Asn - Gly ペプチドを含んで成る連結、及び (2) 還元剤により切断されうるジスルフィド結合連結である。

一般に、以降に、及び下記の記載の組換えDNA技術における研究室手順に用いられている命名は公知のものであり、当業界に一般的に利用されている。標準技術をクローニング、DNA及びRNA単離、増幅及び精製のために用いた。DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼ等を包括する一般的な酵素反応は製造者の仕様に従って行った。これらの技術及びその他の技術は一般に Sambrook ら *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989に従って行った。この論文にわたって他の一般的な文献が紹介されている。その中の手順は当業界に公知であると信じられ、そして読み手の便宜のために紹介する。その中に含まれている全ての情報は引用することで本明細書に組入れる。

所望の二価特異性抗体を発現可能な本発明の核酸配列は様々な技法により様々な異なるポリヌクレオチド（ゲノム又はcDNA、RNA等）より形成されうる。適当なゲノム配列の連結が現在最も一般的な製造方法であるが、しかしcDNA及び合成配列も利用できうる（欧州特許出願85102655.8、85305604.2、84302368.0及び85115311.4号、

並びにPCT出願GB85/00392及びUS86/02269号を参照のこと；共に引用することで本明細書に組入れる）。

DNA構築体は典型的には、天然に一体化している又は外来のプロモーター領域を含む、コード配列に作動連結している発現コントロールDNA配列を含むであろう。好ましくは、この発現コントロール配列は、真核宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトせしめることの可能なベクター中の真核プロモーター系であろう。ベクターを適当な宿主の中に組込んだら、その宿主をスクレオチド配列の高レベル発現にとって適切な条件のもとで維持し、そして二価特異性抗体を回収及び精製する。

上述した通り、このDNA配列は、その配列を発現コントロール配列に作動連結せしめた後（即ち、構造遺伝子の翻訳を確実にする位置に）、宿主の中で発現されるであろう。これらの発現ベクターは典型的にはエピソードとして、又は宿主の染色体DNAの組込部として宿主生物の中に複製可能となる。一般に、発現ベクターは選択マーカー、例えばテトラサイクリン又はネオマイシンを、所望のDNAで形質転換されたこれらの細胞の検出を可能とするために含むであろう（引用することで本明細書に組入れる米国特許第4,704,362号を参照のこと）。

一般に、二価特異性抗体の成分をエンコードするDNA配列のクローニングのために原核細胞が利用できる。大腸菌が本発明のDNAの配列のクローニングにとって特に有用な原核宿主の一つである。利用できる特定の菌株にはHB101、DH-1及びpHR-1が含まれる。

利用にとって適当なその他の微生物宿主には、バチルス属、例えばバチルス スブチルス (*Bacillus subtilis*)、及びその他の腸内細菌、例えばサルモネラ (*Salmonella*)、セラチア (*Serratia*) 及

び様々なシュードモナス (*Pseudomonas*) 種が含まれる。これらの原核宿主においても、典型的には宿主細胞に適応する発現コントロール配列 (例えば複製起点) を含むであろう発現ベクターを作り出すことができる。更に、任意の数のよく知られている様々なプロモーター、例えばラクトースプロモーター系、トリプトファン (*trp*) プロモーター系、ペクターラクターゼプロモーター系又はファージラムダに由来するプロモーター系が存在してよい。このプロモーターは典型的には、任意的にオペレーター配列で発現をコントロールし、そして転写及び翻訳を開始及び終了させるためのリボソーム結合部位配列等を有する。

その他の微生物、例えば酵母も発現のために利用できる。サッカロマイシス (*Saccharomyces*) は好適な宿主であり、所望の発現コントロール配列、複製起点、停止配列等を有する適当ベクターを有している。典型的なプロモーターには3-ホスホグリセラートキナーゼ及びその他の解糖酵素が含まれる。誘発性酵母プロモーターにはとりわけ、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチクロームC、並びにマルトース及びガラクトース利用にとって重要な酵素に由来するプロモーターが含まれる。

酵母の中で利用するためのベクターを構築するとき、プラスミド YEp7 が利用できる (Stinchcombら, *Nature*, 282:39(1979)を参照のこと)。このプラスミドは、トリプトファンを含む培地での増殖能力を欠く突然変異株にとっての選択マーカーである *trp 1* 遺伝子を含む。*trp 1* 遺伝子の存在は形質転換突然変異細胞が選択培地の中で増殖し、同定されることを可能とする。

微生物に加えて、哺乳動物組織細胞培養物も本発明のポリペプチドの製造に利用できる (Minnacker 「From Genes to Clones」 VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987) を参照のこと; 引用すること

で本明細書に組入れる)。真核系細胞が実際には好ましく、その理由は当業界においてインタクトイムノグロブリンを分泌可能な数多くの適当な宿主細胞系が開発されているからであり、そしてそれにはCHO細胞系、種々のCOS細胞系、Bela細胞、ミエロース細胞系等が含まれるが、しかし形質転換されたB細胞又はハイブリドマが好ましい。これらの細胞にとっての発現ベクターは発現コントロール配列、例えば複製起点、プロモーター、エンハンサー (Queen, Cら *Immunol. Rev.* 82:49-68(1986); 本明細書に引用することで組入れる)、並びに必須のプロセッシング情報部位、例えばリボソーム結合性部位、RNA スプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写ターミネーター配列を含む。好適な発現コントロール配列はイムノグロブリン遺伝子、サイトメガロウィルス、SV40、アデノウィルス、牛バビロマウィルス等である。

真核系DNA転換はベクターの中にエンハンサー配列を挿入することによって高めることができる。エンハンサーはプロモーターによる転写を高める10-300bpのシス作用配列である。エンハンサーは転写単位に対して5'又は3'のときに転写を有効に高める。それらはイントロン内に、又はそれ自体のコード配列内にあるときも有効である。典型的には、ウィルス性エンハンサー、例えばSV40エンハンサー、サイトメガロウィルスエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが利用される。哺乳動物系に由来するエンハンサー配列、例えばマウスイムノグロブリン重鎖エンハンサーも一般に利用されている。

哺乳動物発現ベクター系は一般に選択マーカー遺伝子も含むであろう。適切なマーカーの例には、ジヒドロホレートリグクターゼ遺伝子 (DHFR)、チミジンキナーゼ遺伝子 (TK) 又は耐薬剤性を担う原核系遺伝子が含まれる。最初の二つのマーカー遺伝子は増殖地

へのチミジンの添加抜きで増殖能力を欠く突然変異細胞系の利用に優先される。形質転換細胞は従って非付加培地でのその増殖能力により同定できる。マーカーとして有用な原核系耐薬剤遺伝子にはG418、ミコフェノール酸及びヒドロマイシンに対する耐性を担う遺伝子が含まれる。

対象のDNAセグメントを含むベクターは細胞宿主のタイプに依存して知の方法により宿主細胞の中に移入できる。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションが原核細胞に関して一般に利用され、一方、リン酸カルシウム処理もしくはエレクトロポレーションが他の細胞宿主に関して利用されている。哺乳動物細胞を形質転換せしめるのに用いられるその他の方法にはポリプレンの利用、プロトプラスト融合、リボソーム及びマイクロインジェクションが含まれる (一般的には、Sanbrookら前掲を参照のこと)。

発現させたら、二価特異性抗体、エпитープ結合性部位、その二量体、又は連結ロイシンジッパーを有するもしくは有さない個々の軽鎖及び重鎖、又は個々のロイシンジッパー物質それ自体を、当業界の標準の手順、例えば硫酸アンモニウム沈殿、分画カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等によって精製してよい (一般的には、Scopes, R. の *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982) を参照のこと)。所望の通り部分的に又は均質に精製したら、そのポリペプチドはこれにより治療に、又は免疫蛍光染色等のアッセイ手順を開発及び実施するうえで利用できる (一般には、*Immunological Methods*, 第I及び第II巻, Lefkowitz and Pernis編, Academic Press, New York, N.Y. (1979 及び1981) を参照のこと)。

本発明の二価特異性抗体は治療に利用できる。例示であって限定ではないが、それらの塩、自己免疫疾患又はウィルス感染症に利用できる。塩の処置のため、エピトープ結合性成分の一つを典型

的には癌細胞上に優先的に発現される抗原、例えば *erbB-2*、CBA, CD33及びその他の数多くの当業界に公知の抗原に結合させてよい。自己免疫疾患の処置のためには、エピトープ結合性成分の一つを典型的にはT細胞上で発現される抗原、例えばCD4、IL-2レセプター、様々なT細胞抗原レセプター、及び当業界に公知の数多くのその他の抗原に結合させてよい (例えば *Fundamental Immunology*, 第2版, W.B. Paul 編, Raven Press: New York, NY を参照のこと; 引用することで本明細書に組入れる)。ウィルス感染症の処置のためには、エピトープ結合性成分の一つを典型的には特定のウィルスにより感染された細胞上で発現される抗原、例えばヘルペス単純ウィルス及びサイトメガロウィルスの種々の糖タンパク質 (例えば *gB*, *gD*, *gE*)、並びに当業界に公知のその他の数多くの抗原に結合させてよい (例えば *Virology* 第2版, B.N. Fieldら編 (1990), Raven Press: New York, NY を参照のこと; 引用することで本明細書に組入れる)。全てのケースにおいて、第二エピトープ結合性成分は一般に、T細胞又はその他の活性化性シグナルを伝達可能な白血球上で発現されるエピトープ、例えばCD3又はCD16に結合するであろう。

本発明の二価特異性抗体を含んで成る薬理組成物は非経口投与、即ち皮下、筋肉内又は静脈内投与によって有用である。非経口投与用組成物は一般に許容されている担体、好ましくは水性担体中に溶解している抗体の溶液又はそのカクテルを含んで成るであろう。様々な水性担体、例えば水、緩衝水、0.4%の食塩水、0.3%のグリシン等が利用できる。これらの溶液は滅菌であり、そして一般に粒状物質を含まない。これらの組成物は常用の公知の滅菌技術によって滅菌せられる。この組成物は、生理条件に近づけるために必要な薬理学的に許容されている補助物質、例えばpH調整剤及び緩衝剤、毒性調整剤等、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリ



ウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム等を含みうる。これらの配合物の中での二価特異性抗体の濃度は約0.01%以下、通常は少なくとも約0.1%の低きから、5重量%ほどの多くにまで変えてよく、そしてそれは主に液体容量、粘度等を基礎として、選ばれた投与の特定の態様に依じて選択されるであろう。

尚、筋肉内注射にとって典型的な薬理組成物は1mlの滅菌緩衝水及び約1mgの二価特異性抗体を含むように調製される。静脈内点滴のための典型的な組成物は250mlの滅菌リンガー溶液及び10mgの二価特異性抗体を含むように調製される。非経口投与用組成物の調製のための実際の方法は公知であるか又は当業者に明らかであり、そして例えば引用することで本明細書に記入される Remington's Pharmaceutical Science 第15版、Nack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980) に詳しく記載されている。

本発明の二価特異性抗体を貯蔵のために凍結乾燥し、そして使用前に適当な担体の中で再構成することができる。この技術は常用の免疫グロブリンに有効であることが示されており、そして当業界公知の凍結乾燥及び再構成技術が利用できうる。凍結乾燥及び再構成は様々な度合いの抗体活性損失を招くことがあることが当業者に理解されており（例えば常用の免疫グロブリン、IgM 抗体はIgG 抗体よりも大きく活性損失する傾向にある）、従って使用レベルは補足のために調整される。

本二価特異性抗体又はそのカクテルを含む組成物は予防及び/又は治療処置のために投与される。治療用途においては、組成物を、特定の障害に既に患う患者に、その症状及びその合併症を治療又は少なくともある程度緩和するのに十分な量で投与する。これを成し遂げるのに適切な量を「治療的有効用量」と定義する。この利用にとって有効な量は症状の重症度及び患者自身の免疫系の一般状態に

依存するであろうが、しかし投与当たり約0.01〜約100mgの二価特異性抗体の範囲が一般的であり、患者当たり1〜10mgの用量がより一般に利用される。

予防用途においては、この二価特異性抗体又はそのカクテルを含む組成物を、患者の耐性を高めるために疾患状態にない患者に投与する。かかる量は「予防的有効用量」と定義する。この用途においては、ここでもその正確な量は患者の健康状態及び免疫性の一般レベルに依存するが、しかし一般には投与当たり0.1〜100mg、特に患者当たり1〜10mgに範囲する。

組成物の一回又は数回の投与は、処置医師により運ばれる用量レベル及びパターンによって実施される。全ての状況において、薬理組成物は患者の有効な処置に十分なる量の本発明の二価特異性抗体を供すべきである。

本明細書に記載の二価特異性抗体は診断及びイメージング目的のために、エпитープ結合性成分と、検出試薬、例えばフェリチン (Hammerlingら(1968) J. Exp. Med. 128: 1461) 又は西洋ワサビペルオキシダーゼ (MilsteinとCuello(1983) Nature 305: 537) とを架橋するのに利用することもできる。この検出試薬はエピトープ結合性成分に、この二価特異性抗体の第二エピトープ結合性成分を介して連結されるか、又は本明細書に記載のロイシンジッパーを形成するヘテロ二量体によって第一エピトープ結合性成分に直接連結される。同様に、メタロチオネイン、即ち重金属原子に結合するタンパク質を、融合タンパク質としてFos ロイシンジッパーと共に、且つ Fab'-Jun に連結されて発現される。得られる生成物は放射性核種をイメージング及び治療に関する抗原結合部位に運搬するために利用できうる。同様に、例示であり限定でなく、タンパク質毒素、例えばリシン又はシュードモナスアエルギノーズ

(*Pseudomonas aeruginosa*) 外毒素も、Fos ロイシンジッパーに融合させ、次いで Fab'-Jun に連結せしめて、免疫毒素として利用されることもできる。

細胞活性に対する保護もしくは検出、又は特定の細胞表面レセプターの存在における課題の二価特異性抗体を伴う利用のためのキットも供給してよい。従って、本発明の課題の組成物は通常は容器中の凍結乾燥形態において、単独で、又は所望の細胞タイプに特異的な別の抗体と一緒に供給される。ラベルもしくは毒素にコンジュゲートされている、又はコンジュゲートされていないこの二価特異性抗体はキットの中で、緩衝剤、例えばトリス、リン酸塩、炭酸塩等、安定剤、殺菌剤、不活性タンパク質、例えば血清アルブミン等、及び一連の使用のための仕様書と共に含まれている。一般にこれらの物質は活性抗体の量を基礎として約5重量%以下、そして通常は抗体濃度に基づいて少なくとも約0.001重量%の総重量において存在しているであろう。しばしば、この活性成分を希釈するために不活性増量剤又は賦形剤を含ませることが所望され、この場合、その賦形剤は組成物全体の約1〜99重量%において存在しうる。アッセイにおいて二価特異性抗体に結合可能な第二抗体を利用するとき、これは別々のバイアルの中に通常入っているであろう。この第二抗体は典型的にはラベルにコンジュゲートされており、そして上記の抗体組成物と類似の方法で調合される。

下記の例は限定ではなく例示のために提供される。

#### 実 験

##### プラスミドの構築

Fos 及び Jun のロイシンジッパー領域に関する遺伝子を別々に、4種の重組合成オリゴヌクレオチドを用いて合成した (モデル380 B DNA合成装置、Applied Biosystems, Foster City, CA)。次に各遺

伝子を Von と Fried (Von と Fried (1989) Nucl. Acid. Res. 17: 4849) により述べられているポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法 (Saiki ら、(1988) Science 239: 487) を用いてマウス IgG2a遺伝子 (図1) の C<sub>μ</sub>2エクソンの第一コドンに段階的に融合させた。得られる PCR 生成物は 911bp の Xho I - Sal I フラグメントであり、C<sub>μ</sub>1エクソンの一部、C<sub>μ</sub>1: Kイントロン、ヒンジ (H) エクソン、H: C<sub>μ</sub>2イントロン及び C<sub>μ</sub>2/ジッパーエクソンを含む。Xho I 部位は C<sub>μ</sub>1エクソン内の天然の制限部位であるが、Sal I 部位は PCR 中にジッパー配列の末端に付加させたものである。マウス IgG2a遺伝子の3' 非コード配列を含む 162bp の Sal I - BamH I フラグメントも PCR により作り上げた。この配列は C<sub>μ</sub>3エクソンの停止コドンのすぐ3' で始まり、そしてポリアデニル化シグナルを供する。Jun 及び Fos 構築体のために、Xho I - Sal I 及び Sal I - BamH I フラグメントを次に共にマウス重組発現ベクターの Xho I と BamH I 部位との間に挿入し、C<sub>μ</sub>2 及び C<sub>μ</sub>3 エクソンを C<sub>μ</sub>2/ジッパーイオンに交換した (図2)。選択マーカーとして突然変異ジヒドロレトリダクターゼ遺伝子 (mdhfr) (Simonsen と Levinson (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2495)、ヒトサイトメガロウイルス (hCMV) 主要即時初期プロモーター及び転写開始のためのエンハンサー (Boshart ら (1985) Cell 41: 521)、並びにマウス IgG2a 定常領域を含む重組発現ベクターを、標準の方法によって対応のフラグメントから構築した。

マウス抗 Tac 重組遺伝子 (Queen (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029) を含む Xba I フラグメントを次に Junジッパー含有ベクターの Xba I 部位 (図2) に挿入してプラスミド pTAC-Jun を作った。同様に、ハムスター抗体 145-2C11 重組遺伝子の V<sub>H</sub> 遺伝子を Fosジッパー含有ベクターの中に挿入してプラスミド p145-



2C11-Fos を作った。軽鎖発現のため、hCMVプロモーター及びエンハンサー、並びに先行イントロンの一部を含むネズミ C $\alpha$ 遺伝子を含む二種類のベクターを用いた。これらのベクターのうちの一方はキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(gpt)遺伝子を含む(MulliganとBerg (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2072)、そして他方はヒドロマイシンBホスホトランスフェラーゼ(hyg)遺伝子を含む(BiochlingerとDiggelmann(1984) *Mol. Cell. Biol.* 4: 2929)。これらのベクターは標準の方法により対応のフラグメントから構築した。XbaI部位を抗Tac及び145-2C11のV $\kappa$ 遺伝子フラグメントに、PCRによって付加した。抗-TacのV $\kappa$ 遺伝子をgpt含有ベクターの中に、そして145-2C11のV $\kappa$ 遺伝子をhyg含有ベクターの中にクローンして、対応のプラスミドpTAC-K及びp145.2C11-Kを作り上げた。

**トランスフェクション。**トランスフェクションはGene Racer装置(Bio-Rad, Richmond, CA)を用いる、製造者の仕様書に従う350V及び25 $\mu$ PD容量での電圧パルスによる。トランスフェクションの前に、軽鎖及び重鎖含有プラスミドをPspIで線状にし、フェノール-クロロホルムで抽出し、そしてエタノール沈殿させた。全てのトランスフェクションはリン酸緩衝食塩水(PBS)の中で20 $\mu$ gの各プラスミドDNA及び10 $\times$  Sp2/0細胞(ATCC CRL 1581)を用いて行った。各トランスフェクション由来の細胞を一夜の96穴組織培養プレートの中でプレートした。48hr後、選択培養を適用した：DMEM+10%の仔牛血清(FCS)+下記のいずれか：RT増殖補充剤(Sigma, St. Louis, Mo)と300 $\mu$ g/mlのキサンチンと1 $\mu$ g/mlミコフェノール酸)又は500 $\mu$ g/mlのヒドロマイシン(Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN)。ウェルが生存細胞コロニーで密になった後、各ウェル由来の増殖をヤギ抗-マウスガンマーIg(Sigma)

を用いるELISAにより分泌抗体の存在及び量についてアッセイした。

**フローサイトメトリー。**2.5 $\times 10^4$ のHuT-102細胞を100 $\mu$ lのPBS中の様々な濃度の抗-Tac、抗-Tac-J $\kappa$ 又は二価特異性F(ab'-ジッパー)と4℃で30分インキュベートした。次に細胞をPBSの中で洗い、50ngのFITCコンジュゲート化ラット抗マウスサッパー(Pandex, Mundelein, IL)を含む25 $\mu$ lのPBSの中に再懸濁し、そして4℃で30分インキュベートした。細胞をPBSで洗い、1%のバラホルムアルデヒドで固定し、そしてPACScan(Becton Dickinson, Mountain View, CA)により分析した。抗-CD3又はその誘導体のEL4細胞への結合を同様に分析した。二価特異性F(ab'-ジッパー)の濃度を評価するため、蛍光強度、対、抗-CD3抗体濃度の標準曲線を利用した。

**F(ab'-ジッパー)の精製。**トランスフェクト体の増殖上清液をモノクローナルラット抗-マウスサッパーセファロースカラム(Zymed, South San Francisco, CA)に通し、そして結合タンパク質を0.2Mのグリシン-HCL, pH2.1で溶出させた。溶出した画分をトリスブースで中和し、そしてPBSに対して透析した。一の実験において、超トランスフェクト体由来の濃縮増殖液を10mMのMES緩衝液の中に1:4に希釈することによってpH5.2に合わせ、次いでFPLC系(Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ)上での分離のためにBAKERBOUND ABxカラム(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)に載せた。結合タンパク質を0~0.25Mの(NH $_4$ ) $_2$ SO $_4$ の線形勾配で溶出させ、そしてF(ab'-ジッパー)タンパク質をELISA又は上記のフローサイトメトリーにより同定した。インビトロで形成された二価特異性F(ab'-ジッパー)も同様にABxカラムクロマトグラフィーにより精製した。不純物中のF(ab'-ジッパー)濃度を上記のフローサイトメトリーにより評価した。純粋なタンパク質

分におけるその濃度を280nmでの吸収によって、1mg/mlが1.4のA $_{280}$ を有すると仮定して決定した。

#### インビトロでの二価特異性F(ab'-ジッパー)の形成

抗-Tac-J $\kappa$ と抗-CD3-Fosのホモ二量体をPBSの中で2-メルカプトエタニルアミンで37℃で1時間かけて還元して、Fab'-ジッパーを形成せしめた。それらを次に混合し、そしてレドックス緩衝液(50mMのトリス-HCL, pH8.5、1mMのEDTA、500 $\mu$ Mの還元グルタチオン及び500 $\mu$ M酸化グルタチオン)に対して4℃で48hr透析し、そしてその緩衝液を透析によりPBSに戻した。

**マウスエフェクター細胞による細胞障害アッセイ。**DMEM+10%のFCS+4 $\mu$ g/mlのコンカナバリンAの中でマウス脾臓細胞を培養した。3日後、その細胞をDMEM+10%のFCS+10U/mlの組換えIL-2(Amgen, Thousand Oaks, CA)の中で1:2に継代培養した。エフェクター細胞を4日後に回収し、そして細胞障害アッセイにおいて用いた。標的細胞を、HuT-102細胞を100 $\mu$ ClのNa $_2$  $^{51}$ CrO $_4$ (Amersham, Cblago, IL)と、100 $\mu$ lのDMEMの中で37℃で1hインキュベートすることによって調製した。その細胞を使用前にDMEMで2回洗った。細胞障害性を96穴組織培養プレートの中での標準 $^{51}$ Cr-放出アッセイによって測定した。各ウェルは50 $\mu$ lのPBS中の二価特異性F(ab'-ジッパー)、50 $\mu$ lのDMEM中の10 $\times$ の $^{51}$ Cr-ラベル化HuT-102細胞、及びDMEM中の50 $\mu$ lのエフェクター細胞を受け入れた。各ウェル中の総容量は200 $\mu$ lとした。その細胞混合物を37℃で4hインキュベートして溶解させた。遠心後、上清液を各ウェルから取り出し、HuT-102細胞からの $^{51}$ Crの放出についてアッセイした。細胞障害アッセイにおける比放射のパーセンテージは：[二価特異性F(ab'-ジッパー)により放出された計測数、引く、F(ab'-ジッパー)を加えずに放出された計測数]/

[0.1%のSDSにより放出された計測数、引く、F(ab'-ジッパー)を加えずに放出された計測数] $\times 100$ として計算した。細胞障害アッセイにおける全ての点は三重測定で決定され、そしてその平均値をプロットした。

#### Fab'-ロイシンジッパー遺伝子の構築及びトランスフェクション

我々は、J $\kappa$ 又はFosロイシンジッパー配列をマウスIgG2a遺伝子のC $\alpha$ 2エクソンの第一コドン(図1)に連結するためにPCR法を利用した。融合連結部において、2個のグリシンコドンを導入して、その連結をタンパク質生成物においてより柔軟なものとなるようにした。ロイシンジッパー配列の後方に、停止コドン及びマウスIgG2a遺伝子に由来するポリアダニル化シグナルを含む配列を含ませた。その遺伝子融合体を、重鎖合成のために事前に使用されている発現ベクターの中に個別に挿入した(図2)。所望の抗体についてのV $\kappa$ 遺伝子を得られる新たなベクターのXbaI部位の中に挿入できる。mRNA転写物はこれにより各プラスミド上のCMVプロモーターから開始し、そしてV $\kappa$ 、C $\alpha$ 1、ヒンジ及びC $\alpha$ 2/ロイシンジッパーエクソンが互いに断片し合うであろうことが予測される。

J $\kappa$ 発現プラスミドの中に、我々はマウス抗-Tac抗体のV $\kappa$ 遺伝子を、そしてFosプラスミドの中に、ハムスター145-2C11抗体のV $\kappa$ 遺伝子を挿入した。抗-Tac抗体はヒトIL-2レセプター(IL-2R)のp55鎖に結合する(Uchlyanら(1981) *J. Immunol.* 126: 1393)；その重鎖及び軽鎖遺伝子は既にクローンされている(Queenら(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10029)。145-2C11抗体はマウスCD3複合体のE鎖を認識する(Leeら、(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1374)；その重鎖及び軽鎖もクローンされている。各V $\kappa$ 遺伝子はシグナル配列及びJセグメントを含み、そしてC $\alpha$ 1ドメインへのスプライシングを可能とするス

ブライズドナー配列がそれに続いた (Queen ら (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029)。抗-Tac 及び 145-2C11 の VL 遺伝子をマウス V<sub>H</sub> 遺伝子と共にそれぞれ含む類似のプラスミドを調製した (図2)。

各重鎖発現プラスミドを対応の軽鎖プラスミドと共にネズミミエローマ細胞系 Sp2/0 に同時トランスフェクトした。安定なトランスフェクト体を抗-Tac-Jun について spl マーカー及び抗-CD3-Pos についての hyg マーカーを用いて選別した。各トランスフェクト体由来の培地上清物をヤギ抗マウスガンマ抗体による ELISA によって抗体タンパク質の存在についてスクリーンした。ELISA-陽性トランスフェクト体をフローサイトメトリーを利用して確認し、CD3 及び p55 陽性細胞系への抗体分子結合の存在についてその上清液を試験した。両ケースにおいて、トランスフェクト体は 10<sup>5</sup> のミエローマ細胞当たり約 1 の頻度で獲得された。そのトランスフェクト体は約 0.1~2  $\mu$ g/ml/10<sup>5</sup> 細胞/24 h の F(ab')<sub>2</sub> 様分子を分泌した。これらの分子の生産レベル類似の実験の中での完全抗体分子のそれより若干低いことが認められた。抗-Tac-Jun 及び抗-CD3-Pos について高い生産性のトランスフェクト体を更なる特性決定のために増殖させた。

#### 抗-Tac-Jun 及び抗-CD3-Pos の精製及び特性決定

抗-Tac-Jun 及び抗-CD3-Pos を精製するためにアフィニティークロマトグラフィーを利用した。各種のトランスフェクト体由来の上清液をラット抗-マウスカッパーセファロースカラムに吸着させた。カラムに結合したタンパク質をグリシン-HCl により pH2 で溶出させた。PBS に対する透析の後、溶出したタンパク質を還元又は還元せずに SDS PAGE ゲル (Laemmli (1970) *Nature* 227:680) で分析した (図3)。還元タンパク質は、軽鎖及び重鎖 Pd-ジ

ッパーのそれぞれに対応する 25Kd 及び 31Kd の見かけ分子量の 2 本のバンドのみを示した。非還元タンパク質は約 25Kd 以下及び 100Kd 以上の見かけ分子量の主要バンドを示した。両バンドが軽鎖及び Pd-ジッパーに還元されるという事実において、それらは遊離の軽鎖 (25Kd) 及び抗-Tac-Jun と抗-CD3-Pos との F(ab'-ジッパー)<sub>2</sub> 二量体を示すようである。更に、抗-CD3-Pos サンプルは、下記のように確認した通りに軽鎖二量体より成る 50Kd のバンドを含んでいた。タンパク質を精製するために用いたアフィニティークロマトグラフィーは遊離軽鎖及び軽鎖二量体を捕獲するが、遊離 Pd-ジッパー鎖を捕獲しないことが述べられうる。従って、この 50Kd のタンパク質は Pd-ジッパー二量体ではないと考えられる。SDS PAGE 上でのタンパク質の泳動に及ぼす鎖内ジスルフィド結合の影響は還元した又はしていない軽鎖の泳動度を比較することによって観察できる。

#### インビボでの二価特異性 F(ab'-ジッパー)<sub>2</sub> の形成

プラスミド構築体が適切な F(ab'-ジッパー)<sub>2</sub> ホモ二量体の発現を導きうることを示したところで、我々は次に二価特異性 F(ab'-ジッパー)<sub>2</sub> が、抗-Tac-Jun 及び抗-CD3-Pos にとって必要な 4 種全てのペリペプチド鎖により単一トランスフェクト体の中でインビボで産出されることを示した。抗-Tac-Jun トランスフェクト体に抗-Tac-Jun のためのプラスミド構築体で更にトランスフェクトした。spl 及び hyg マーカーの両者を用いて超トランスフェクト体を選別し、そして精製 IL-2R p55 に結合できる抗体タンパク質の分泌について ELISA によりスクリーンした。これらの超トランスフェクト体由来の上清液を抗-Tac 及び抗-CD3 活性の存在についてフローサイトメトリーにより更に分析した。

抗-Tac 及び抗-CD3 活性の両者を産出する代表的な超トランス

フェクト体をその抗体生成物を更に特性決定するために増殖させた。この超トランスフェクト体由来の培地上清液を ABx カラムで、(HR.)、SO<sub>2</sub> 勾配で溶出させながら PPLC クロマトグラフィーにより分析した (図4A)。マウス重鎖及び軽鎖についての ELISA アッセイにおいて反応性タンパク質を含むピーク 5 つのみが溶出した (図4B)。画分 I、II、III、IV 及び V として示す抗体陽性ピークを CD3<sup>+</sup> EL4 T-リンパ腫細胞及び IL-2R<sup>+</sup> HuT-102 細胞に対する結合性についてフローサイトメトリーによりアッセイした。画分 II は抗-Tac 及び抗-CD3 活性の両方を含み、一方、画分 I はほとんどの抗-Tac 活性を含み、そして画分 III と IV と V は抗-CD3 活性のみを含んでいた (図4C)。別の実験において、抗-Tac-Jun 及び抗-CD3-Pos をそれぞれ発現するトランスフェクト体由来の培地を同系でクロマトグラフィーにかけた。抗-Tac-Jun は画分 I と同じ位置において、そして抗-CD3-Pos は画分 IV の位置で溶出した (データは示さず)。従って、画分 II は二価特異性抗体を含み、そして画分 III 及び V は抗-CD3 活性のみを有する他のハイブリッド抗体を含んでいた。

画分 II が実際に二価特異性活性を含むかどうかを実証するために、我々は活性化マウス脾臓 T 細胞による <sup>51</sup>Cr-ラベル化 HuT-102 細胞の溶解を仲介するためにそれを用いた (図5)。画分 II 中のタンパク質は標的細胞を 20ng/ml 以下の濃度まで溶解せしめる。精製抗-CD3-Pos 及び抗-Tac-Jun ホモ二量体は単独で、又は組合せて、細胞を溶解するうえで総合的に有効でなかった。これらのデータは、二価特異性抗体がインビボで事実上形成されていることを示唆する。

インビボでの二価特異性 F(ab'-ジッパー)<sub>2</sub> の形成。ホモ二量体 F(ab'-ジッパー)<sub>2</sub> タンパク質はヒンジ領域で還元されて

Fab'-ジッパーモノマーを形成しうる。様々な濃度の 2-メルカプトエチルアミンを、重鎖 Pd-ジッパーからの軽鎖の解離を伴うことなく、Fab'-ジッパーを形成する最良の条件を決定するために用いた。還元生成物を非還元条件のもとで SDS PAGE で分析した。精製抗-Tac-Jun の還元のための最良の条件は PBS 中での 4mM の 2-メルカプトエチルアミンにより 37℃ で 1 h である。抗-CD3-Pos は同一の条件のもとで 2mM の 2-メルカプトエチルアミンを必要とした。これらの条件のもとで還元したこれらのタンパク質を図6に示す。両ケースにおいて、Fab'-ジッパーに相当する 50~55Kd の一連のタンパク質バンドが還元により出現した。この不均一性の理由は不明であるが、しかしそれは他の者によって以前から観察されている (Curran と Franza (1988) *Cell*, 55:395)。抗-CD3-Pos サンプル中の軽鎖二量体は非常にすばやくモノマーに還元もされうる。これらの条件のもとで、Pd-ジッパーバンドの非存在下により証明される通り (図3で比較)、Fab'-ジッパーからの軽鎖の解離は最少限であった。

抗-Tac 及び抗-CD3 Fab'-ジッパータンパク質を 1:1 の比で混合して 100  $\mu$ g/ml の最終濃度にし、レドックス緩衝液に対して透析し、次いで PBS に対して透析した。Fab'-ジッパーのバンドは消失し、そして F(ab'-ジッパー)<sub>2</sub> タンパク質に相当する新たなバンドが出現した (図6、レーン5)。この新たなタンパク質をインビボで産出させた F(ab'-ジッパー)<sub>2</sub> に関して用いたものと同じ条件のもとでの ABx クロマトグラフィーにより分離した。3 つのメジャー及び 2 つのマイナータンパク質ピークがクロマトグラフィーにあった (図7A)。ELISA、フローサイトメトリー (図7B) 及び SDS PAGE (図8) の組合せをピークの同定のために用いた。常通り (PT) 画分は過剰の軽鎖及び軽鎖二量体のみを含んでいた。

最初に抽出したメジャーピーク（画分Ⅰ）はほとんど軽鎖を含んでいたが、しかし微量の抗-Tac-Jen もフローサイトメトリーにより検出された。更に、この画分及びそれ以降の画分は、非特異的なタンパク質吸着を防ぐために ABx カラムを予備処理するのに用いた BSA を含んでいた。第二抽出ピーク（画分Ⅱ）は微量の抗-Tac 及び抗-CD3 活性をフローサイトメトリーによれば含んでおり、そして一部の凝集状の F(ab' - ジッパー)より成る。最後のピーク（画分Ⅳ）は抽出位置（図4Aの画分Ⅳを参照のこと）及び BL4 細胞結合活性により抗-CD3-Pos と同定された。

クロマトグラフィー上の第三のメジャーピーク（画分Ⅲ）はインビボで産出せしめた二価特異性 F(ab' - ジッパー)とまさに同じ位置で抽出した（図9A、画分Ⅲ）。この画分は CD3<sup>+</sup> BL4 細胞及び IL-2R<sup>+</sup> HuT-102 細胞の両者に結合した。一つの主要タンパク質バンドのみがこの画分の SDS PAGE において認められ（図8A、レーン4）、その分子量は F(ab' - ジッパー)について予測されるものであった。還元により、それは二つの近位に移動する Fd-ジッパーバンドと、二つの大まかに等しい量の二つの異なる軽鎖バンドに解離した（図8B、レーン4）。このサンプルの横に抗-CD3-Pos ホモ二量体を流すことにより、我々は上方の Fd-ジッパーバンドを抗-CD3-Pos Fd-ジッパーと、そして上方の軽鎖バンドを抗-CD3-Pos 軽鎖と同定できた（図8Bのレーン4と5）を比較）。抗-Tac-Jen と抗-CD3-Pos ホモ二量体は別の画分の中で抽出したため、画分Ⅲは抗-Tac-Jen と抗-CD3-Pos とのハテロ二量体より成らなければならない。この画分が二価特異性抗体を含むかを確認するため、我々はマウス T 細胞による HuT-102 細胞の標的殺傷のためにそれを用いた。特異的な溶解が 10ng/ml 以下の濃度で認められた（図9）。総合すると、これらのデータは、ジスル

フィド交換によりインビトロで形成された F(ab' - ジッパー)が主として二価特異性抗-Tac × 抗-CD3 であり、若干の副産物の形成が伴っていることを示す。

以上より、本発明の二価特異性抗体は他の二価特異性抗体に勝る数多くの利点を供することが理解されたであろう。2 個のロイシンジッパーによる対合的連結により形成されていない二価特異性抗体に比べ、本二価特異性抗体は高純度及び収率でより経済的に生産されうる。この向上した純度及び収率は二価特異性抗体がヒトもしくは動物の疾患の治療又は疾患の予防に利用されうることを可能とする。

本発明を例示のために詳しく説明してきたが、本発明はそれらに限定されることはないことが明らかであろう。

## 配列表

## (1) 一般情報

(i) 出願人: ツツ、ジェイ ワイ

コステルニー、シュリ エー

コール マイケル エス

(ii) 発明の名称: 二価特異性抗体

(iii) 配列の数: 5

(iv) 連絡先:

(A) 宛先: トレーシー ジェー ダン

(B) 通り: ワン マーケット プラザ、ステュアート

タワー、スーラ 2000

(C) 市: サンフランシスコ

(D) 州: カリフォルニア

(E) 国: 米国

(F) 郵便番号: 94105

(v) コンピュータ読み取り方式:

(A) 媒体のタイプ: フロッピーディスク

(B) コンピューター: IBM PC コンパチブル

(C) 作動システム: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア: パテントイン リリース #1.0、バージョン #1.25

(vi) 発出願人のデータ:

(A) 出願番号: US 07/801,798

(B) 出願日: 1991年11月29日

(C) 分類:

(vii) 代理人/代理店情報:

(A) 名称: ダン、トレーシー ジェー

(B) 登録番号: 34,587

(C) 参照/処理番号: 11823/32

(iv) 通信情報:

(A) 電話: 415-326-2400

(B) テレファックス: 415-326-2422

(2) SEQ ID NO: 1 についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 7 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 線状

(ii) 分子の型: ペプチド

(ix) 特徴:

(A) 名称/キー: 領域

(B) 位置: 2..7

(D) 他の情報: /備考=「残基 2~7 は 20 の天然のアミノ酸のいずれであってよい」

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 1:

Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

(2) SEQ ID NO: 2 についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 151 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 線状

(ii) 分子の型: DNA (ゲノム)

(ix) 特徴:

(A) 名称/キー: インترون

(B) 位置: 1..16

(ix) 特徴:

(A) 名称/キー: CDS

(B) 位置: 17..143

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 2:

CCATCTCTCC TCATCA GCA GGC GGC GGC ATC GCC CGG CTC GAG GAA AAA  
49  
Aia Gly Gly Arg Ile Ala Arg Leu Glu Glu Lys  
1 5 10  
GTG AAA ACC TTG AAA GCF CAG AAC TCG GAG CTC GCG TCC ACC GCC AAC  
97  
Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn  
15 20 25

ATG CTC AGG GAA CAG GTG GCA CAG CTT AAA CAG AAA GTC ATG AAC T  
 143  
 Met Leu Arg Glu Glu Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Asn  
 30 35 40  
 GAGTCGAC  
 151

## (2) SEQ ID NO: 3 についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 42アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 線状

## (ii) 分子の型: タンパク質

## (xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 3:

Ala Gly Gly Arg Ile Ala Arg Leu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys  
 5 10  
 Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln  
 20 25 30  
 Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Asn  
 35 40

## (2) SEQ ID NO: 4 についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 151塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 線状

## (ii) 分子の型: DNA (ゲノム)

## (ix) 特徴:

(A) 名称/キー: インترون

(B) 位置: 1..16

1 CCATGCTGCTCATCA GCA GGC GGC GGC ATG GGC GGC CTC GAG GAA  
 H:G2 イノウ 1-Ala Gly Gly Arg Ile Ala Arg Leu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys  
 47 AAA GTG AAA ACC TTG AAA GGT CAG AAC TCG GAG CTC GCG TCG  
 11-Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser  
 89 ACG GGC AAC ATG CTC ACG GAA CAG GTG GCA CAG CTT AAA CAG  
 25-Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln  
 131 AAA GTC ATG AAC TGA GTCGAC  
 39-Lys Val Met Asn 停止

FIG. 1a.

1 CCATGCTGCTCATCA GCA GGC GGC TTA ACT GAT ACA CTC GAA GCG  
 H:G2 イノウ 1-Ala Gly Gly Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala  
 47 GAG ACC GAG CAG CTG GAA GAT AAG AAG TCT GCT CTG CAG ACC  
 11-Glu Thr Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr  
 89 GAG ATT GGC AAC CTG CTG AAG CAG AAG GAA AAA CTG GAG TTC  
 25-Glu Ile Ala Asn Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe  
 131 ATC CTG GGC GGC TGA GTCGAC  
 39-Ile Leu Ala Ala 停止

FIG. 1b.

(A) 名称/キー: CDS

(B) 位置: 17..143

## (xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 4:

CCATGCTGCTCATCA GCA GGC GGC TTA ACT GAT ACA CTC CAA GCG GAG  
 49  
 Ala Gly Gly Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Glu  
 5 10  
 ACC GAC CAG CTG GAA GAT AAG AAG TCT GCT CTG CAG ACC GAG ATT GCC  
 97  
 Thr Asp Glu Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala  
 15 20 25  
 AAC CTG CTG AAG GAG AAG GAA AAA CTG GAG TTC ATC CTG GCC GCC T  
 143  
 Asn Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala  
 30 35 40  
 GAGTCGAC  
 151

## (2) SEQ ID NO: 5 についての情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 42アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 線状

## (ii) 分子の型: タンパク質

## (xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 5:

Ala Gly Gly Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Glu Thr Asp Glu Leu Glu  
 1 5 10 15  
 Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala Asn Leu Leu Lys Glu  
 20 25 30  
 Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala  
 35 40

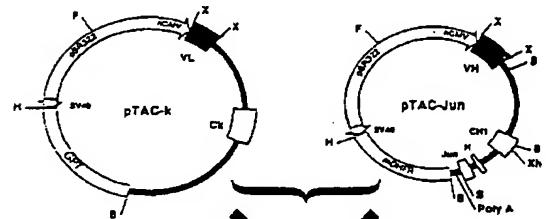


FIG. 2a.

抗-Tac-Jun

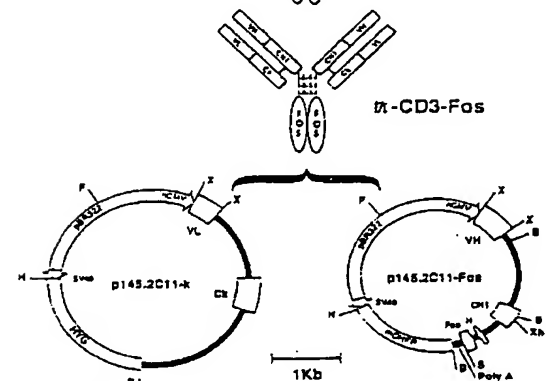


FIG. 2b.

抗-CD3-Fos

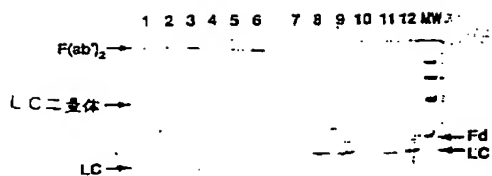


FIG. 3.

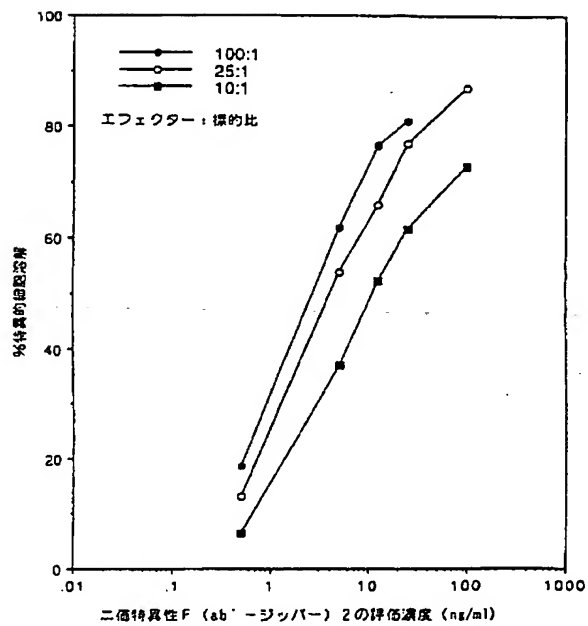
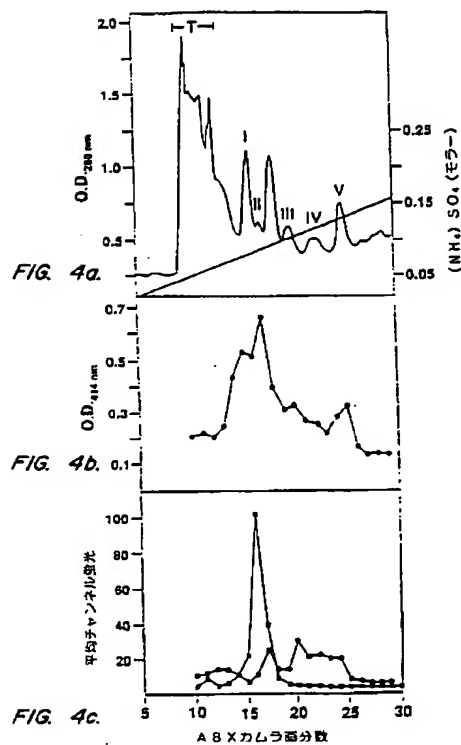


FIGURE 5



BEST AVAILABLE COPY

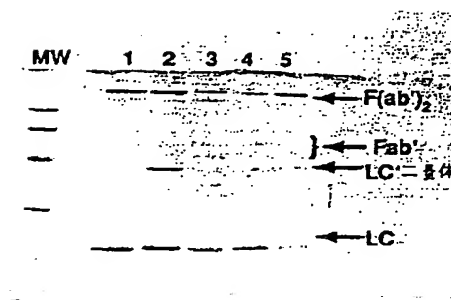
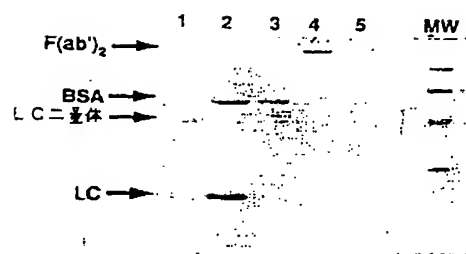
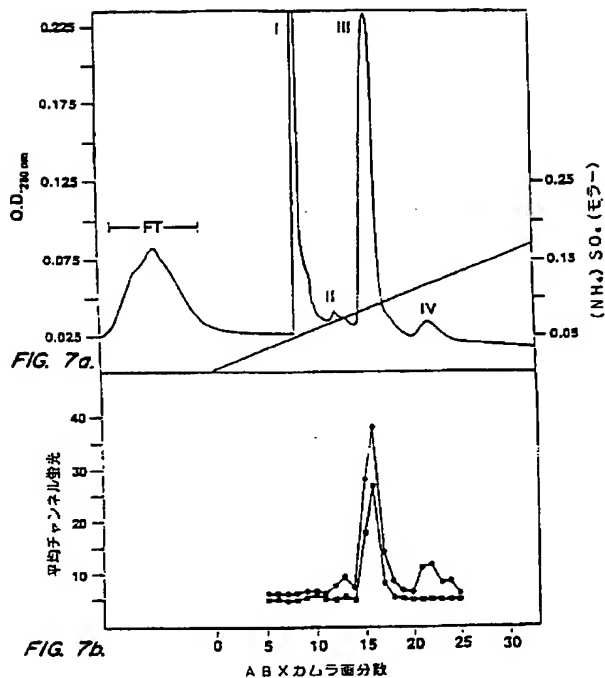


FIG. 6.



BEST AVAILABLE COPY

FIG. 8a.

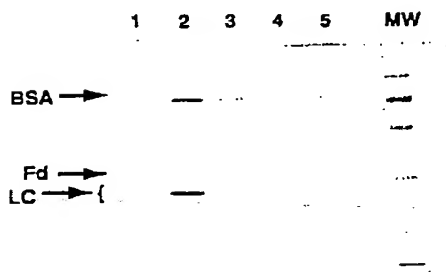


FIG. 8b.

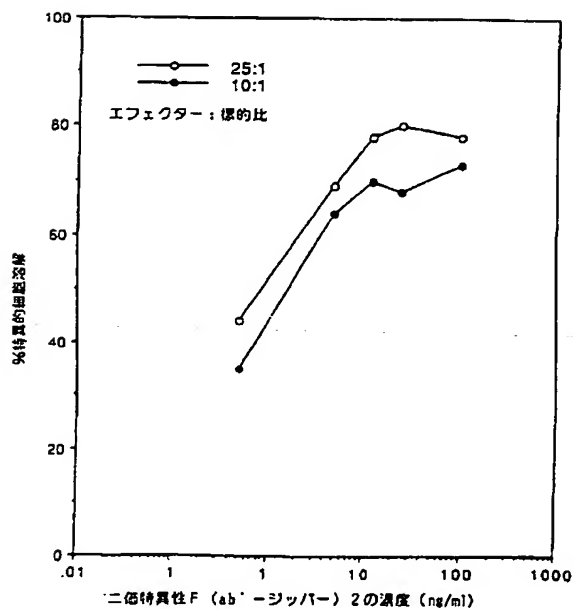


FIGURE 9

国際調査報告		International application No. PCT/JP93/10140
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(3) : C07E 15/28; C12P 21/06; C07H 15/00; A01N 43/04 (2 CL : 379/287.3, 387.1; 43/06.6, 534/27) 31 6/94 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 534/287.3, 387.1; 43/06.6; 534/27; 514/64 Documentation searched where minimum documentation is the source that each document is included in the fields searched Electronic data base searched during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, CAS, MEDLINE, DIALOG		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Journal of Immunology, Volume 139, Number 7, issued 01 October 1987, Chiovini et. al., "Preparation and performance of bisphosphate Pib/gamma-Ig antibody containing thiolated Octadecyl phosphate fragments", pages 2367-2375, see entire article.	1-23
Y	Science, Volume 245, issued 11 August 1989, O'Shea et. al., "Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from Fox and Jan", pages 648-649, see entire article.	1-23
Y	Process Engineering, Volume 4, No. 4, issued 1991, Skold et. al., "Engineering the quaternary structure of an exported protein with a leucine zipper", pages 437-461, see entire article.	1-23
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences, Volume 85, issued October 1988, O'Shea et. al., "Universal bisphosphate antibody for targeting tumor cells for destruction by cytotoxic T cells", pages 7715-7722, see entire article.	1-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family notes.		
* Inventor categories of cited documents: "A" : documents defining the present state of the art which is not considered to be part of prior art "E" : earlier documents published by or for the international filing date "L" : documents which may have priority or which are cited to establish the prior art of the invention or which are cited to establish the prior art of the invention or which are cited to establish the prior art of the invention "P" : documents published prior to the international filing date but later than the priority date "F" : documents published after the international filing date but later than the priority date "X" : documents published after the international filing date but later than the priority date "Y" : documents published after the international filing date but later than the priority date "Z" : documents published after the international filing date but later than the priority date		
Date of the actual designation of the international search : 18 February 1993		Date of mailing of the international search report : 26 FEB 1993
Name and mailing address of the ISA/ Competent Authority of the PCT : ISA PCT Washington, D.C. 20541 Priority No. NOT APPLICABLE		Authorized officer : LEA FENEE Telephone No. (703) 205-0196

BEST AVAILABLE COPY

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup> 識別記号 序内整理番号  
 // A 61 K 39/395 A 9284-4C  
 (C 12 P 21/08  
 C 12 R 1:91)

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, CA, CH, CS, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, K P, KR, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, PL, RO, RU, SD, SE

F I

(72) 発明者 コステルニー, シェリ エー.  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94041,  
 マウンテン ビュー, チキータ アベニュー  
 310  
 (72) 発明者 コール, マイケル エス.  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94306,  
 バロアルト, カレッジ アベニュー 990